



Studies on temporal and spatial regulation mechanisms of plant cell wall construction

著者	九鬼 寛明
号	15
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第352号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122714

	くき ひろあき
氏名（本籍地）	九鬼 寛明
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 352 号
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	Studies on temporal and spatial regulation mechanisms of plant cell wall construction （植物細胞壁構築の時空間的制御機構に関する 研究）
博士論文審査委員	（主査） 教授 西谷 和彦 教授 高橋 秀幸 教授 経塚 淳子

論文内容の要旨

In land plants, cell walls are composed of cellulose microfibril and matrix polysaccharides, and their components form a complex supermolecular network. However, how the supermolecular network is constructed are largely unknown. In this study, I designed a new imaging technique to quantitatively evaluate the configuration of cellulose fibrils during cell wall regeneration in protoplasts derived from *Arabidopsis* rosette leaves.

Confocal laser scanning microscopy using Calcofluor, a dye specific to β -glucans enabled to visualize the fine cellulose fibrils regenerating from protoplasts. As the incubation proceeded, a portion of protoplasts became either oval-shape or bud-shape. To quantitatively evaluate the regeneration process of cellulose fibrils, I utilized an image analysis. Total length of cellulose fibrils increased during incubation. Mean intensity of Calcofluor signals also increased. Skewness of intensity distribution, which is used as an indicator of cytoskeletal bundling, decreased during incubation. Average angle (cellulose orientation) in oval-shaped protoplasts decreased to as low as 45 degrees.

As the proof-of-concept studies, pharmacological analysis was performed. Oryzalin (inhibitor of microtubule polymerization) inhibited the spread of cellulose fibrils, and this was confirmed by the decrease in total length. Morphological change from spherical to the oval shape were also inhibited, and average angle of cellulose fibrils in oval-shaped protoplasts was significantly smaller in Oryzalin treatment than in control. By Taxol (microtubule-stabilizing agent) treatment, extensively bundled cellulose fibrils were generated. Skewness of intensity distribution was higher in Taxol treatment than in control. These results suggest that three metrics, total length, skewness of intensity distribution, and average angle of cellulose fibrils can be used as quantitative criteria for the organization status of cellulose fibrils during cell wall regeneration.

論文審査結果の要旨

植物細胞壁は結晶性のセルロース微繊維とマトリックス高分子群からなる超分子構造をもち、発生制御や病害防御など、植物の生命現象全般において多義的な役割を担う細胞装置である。その構築・再編過程については、構成分子の合成や繋ぎ換え反応の分子解剖は進んでいるものの、超分子構造全体の組み立て過程については、実証的な知見が乏しく、その全容は未解明である。

本研究は、細胞壁再生系を用いて、新生セルロース微繊維の空間配置や存在形態を経時的にモニターするイメージング技術を開発し、この方法を用いて、細胞壁超分子構造の構築が制御される仕組みの解明を目指したものである。そのために、プロトプラストからの細胞壁再生を高い効率で、長時間に亘り継続できる条件を見だし、細胞が伸長し小判型に変形するまでの過程を観察できる実験系を確立した。ついで、再生されたセルロース微繊維をカルコフルオールにより蛍光染色し、プロトプラスト半球上の蛍光パターンを共焦点レーザー顕微鏡によりデジタルイメージデータとして取得し、そのデータより総延長、平均輝度、歪度、平均角度を算出した。その結果、総延長と平均輝度は36時間の再生過程の間に増加したのに対して、歪度と平均角度は低下することを明かにした。これらの結果は、細胞壁再生過程で、セルロース微繊維の配向が伸長方向と垂直な方向から、ランダムな方向に変化したことを示している。次に、セルロース合成装置の移動制御に関わる表層微小管の重合阻害剤であるオリザリン投与により、細胞壁再生時の細胞伸長が抑制され、同時にセルロースの総距離の増加も抑えられた。一方、表層微小管の脱重合阻害剤であるタキソールの投与により微小管が束化をする条件では、微繊維も束化し、歪度が増加した。この結果は、歪度がセルロース微繊維の束化の尺度となりうることを示している。

以上の結果は、本研究で確立した定量的なイメージング解析法が、細胞壁再生過程の分子解剖に有効であることを示している。この方法を用いた細胞壁動態の制御機構の解明は、尚今後に残された課題であるものの、それについては、著者が現在進めている研究の継続により達成できると判断できる。

これらの結果は本論文の著者が、自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有することを示すものである。したがって、九鬼寛明提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。